

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
24. Juni 2004 (24.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/052926 A1** not Sk

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/435, A01K 67/00

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER HEALTHCARE AG; Law & Patents, Patents and Licensing, 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/013281

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,

(22) Internationales Anmeldedatum:  
26. November 2003 (26.11.2003)

AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,  
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,  
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,  
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (BW,  
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,  
TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ,  
DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF,  
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,  
TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

LeA 36493

WO 2004/052926 A1

(54) Title: ISOLATED FLUORESCENT PROTEIN FROM CLYTIA GREGARIA CGFP AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: ISOLIERTES FLUORESZIERENDES PROTEIN AUS CLYTIA GREGARIA CGFP, SOWIE DESSEN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to the nucleotide and amino acid sequence, in addition to the activity and use of the fluorescent protein CGFP (fluorescent protein from *clytia gregaria*).

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP (fluoreszierendes Protein aus *clytiagregaria*).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

ISOLIERTES FLUORESZIERENDES PROTEIN AUS CLYTIA GREGARIA (CGFP), SOWIE DESSEN  
VERWENDUNG

Die Erfindung betrifft die Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität  
und Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP (fluorescence protein of clytia  
gregaria).

**Fluoreszierende Proteine**

Eine Vielzahl an Coelenteraten sind biolumineszent (Morin et al., 1974) und  
10 emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein  
identifizierte Aequorin aus *Aequoria victoria* (Shimomura et al., 1962) emittierte als  
isoliertes Protein ein blaues Licht und nicht wie das phenotypisch beobachtete grüne  
Licht von *Aequoria victoria*. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP)  
aus *Aequoria victoria* isoliert werden, das Aufgrund der Anregung durch das  
15 Aequorin die Meduse phenotypisch grün erscheinen lässt (Johnson et al, 1962;  
Hastings et al., 1969; Inouye et al, 1994).

Grün fluoreszierende Proteine konnten aus unterschiedlichen Organismen isoliert  
werden. Hierzu zählen die Hydzoza (*aequoria*, *halistaura obelia*) und Anthroponen  
20 (*acanthotilum*, *sea cactus*, *cavernularia*, *renila*, *ptilosarcus*, *stylatula*) (Morin et al.,  
1971; Morin et al., 1971 II, Wampler et al., 1971, Wampler et al., 1973, Cormier et  
al., 1973, Cormier et al., 1974, Levine et al., 1982).

Eine Zusammenfassung einiger fluoreszierender Proteine findet sich in Tabelle 1:

**Tabelle 1:**

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer  
 5 (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Green fluorescent protein	Aequorea macrodactyla	AF435433
Green fluorescent protein	Aequoria	L29345
Green fluorescent protein-like protein	Agaricia agaricites	AY037775
Green fluorescent protein-like protein	Agaricia fragilis	AY037765
Green fluorescent protein	Dendronephthya	AF420591
Red fluorescent protein	Entacmaea quadricolor	AY130757
Green fluorescent protein-like protein	Caribbean anemone	AY037777
Green fluorescent protein	Heteractis crispa	AF420592
Green fluorescent protein-like protein	Montastraea annularis	AY037766
Green fluorescent protein-like protein	Montastraea cavernosa	AY037768
Cyan fluorescent protein	Montastraea cavernosa	AY056460
Green fluorescent protein	Renilla muelleri	AY015996
Green fluorescent protein	Renilla renoformis	AF372525
Green fluorescent protein-like protein	Ricordea florida	AY037774

Die fluoreszierenden Proteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und  
 10 physikalischen Eigenschaften. Die spektralen Charakteristika der fluoreszierenden Proteine können sich sowohl auf der Exitations- als auch auf der Emissionssseite unterscheiden. Eine Übersicht der Spektren der Fluoreszenz und der Anregungswellenlänge findet sich in Tabelle 2.

- 3 -

**Tabelle 2:**

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, die Anregungs- und Emissionswellenlängen, die bei Spektralanalysen bestimmt worden sind.

Organismus	Anregung	Fluoreszenz
Aequoria	465-498 nm	509 nm
Halistaura	465 nm	497 nm
Phialidium	485 nm	498 nm
Renilla	498 nm	508 nm

Die Verwendung von fluoreszierenden Proteinen wurde bereits zuvor beschrieben. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 3:

10

**Tabelle 3:**

Übersicht über einige fluoreszierende Proteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des fluoreszierenden Proteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Rénilia mülleri	GFP	US patent no. 6,436,682 WO200168824 WO200257451 WO200134824 WO9949019 US patent no. 6,232,107

- 4 -

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Aequoria	GFP	WO200071565 WO9711094 WO9623898 US patent no. 5,958,713 US patent no. 6,172,188

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von fluoreszierenden Proteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können. Beispiele von mutagenisierten fluoreszierenden Proteinen 5 sind in der Literatur beschrieben (Delagrange et al., 1995; Ehrig et al., 1995; Heim et al., 1996).

Fluoreszierende Proteine finden bereits in unterschiedlichsten Gebieten eine Anwendung. Die Verwendung von fluoreszierende Proteinen beim 'Fluorescence 10 Resonance Energy Tranfer'(FRET), 'Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) und anderen Energietransferverfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben (Mitra et al., 1996; Ward et al., 1978; Cardullo et al, 1988; US patent no. 4,777,128; US patent no. 5,126,508; US patent no. 4,927,923; US patent no. 5,279,943). Weitere Nicht-radioaktive Methoden zum Energietransfer mittels GFP 15 wurden in ebenfalls bereits beschrieben (PCT appl. WO 98/02571 and WO 97/28261)

### Reportersysteme

20 Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unterscheidet mindestens 2 Typen von Reportergenen.

- 5 -

1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.

5

2. Reportergen. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den gebräuchlichsten Reportergenen gehört die beta-Galaktosidase (Alam et al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

10

Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich, wobei diese durch angeregte Emittormoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

15

Man unterscheidet Chemilumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

#### Einordnung der Spezies *Clytia gregaria*

20

Cnidaria→Leptomedusae→Campanulariidae→ *Clytia gregaria*

Die Spezies *Clytia gregaria* gehört zu den Cnidaria, speziell zu den Medusen. Der biolumineszente bzw. fluoreszente Phänotyp wurde bereits 1998 beschrieben (Ward et al., 1998).

30

**Isolierung der cDNA**

Zur Untersuchung der fluoreszenten Aktivität der Spezies *Clytia gregaria* wurden Exemplare im Friday Harbor in Washington State (USA) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde ausschließlich der biolumineszente Ring eines Medusenexemplars verwendet. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Clytia gregaria*, wurde die RNA nach der Methode von Krieg (Krieg et al., 1996) durch Isothiocyanat isoliert.

- 10 Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 10 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

PCR	1.	30	Sekunden	95°C
15	2.	6	Minuten	68°C
	3.	10	Sekunden	95°C
	4.	6	Minuten	68°C

**17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3**

- 20 Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die cDNA wurde in Wasser gelöst und mit SfiI für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden zur Abtrennung kleiner Fragmente gelfiltriert. Die fraktionierte cDNA wurde anschließend in den SfiI geschnittenen und dephosphorilierten λTriplEx2 Vector ligiert. Zur Herstellung einer λ-Phagen Expressionsbank wurden die klonierten cDNA-Fragmente anschließend durch das in vitro Verpackungssystem SMART cDNA Library Construction Kits (Clontech) in λ-Phagen verpackt.

Die Identifizierung der rekombinaten Phagen, die eine cDNA Insertion mit potenzieller Expression von fluoreszenten Proteinen enthielten, wurde ein „library screening“ durchgeführt.

5 Hierzu wurden Bakterienrasen aus transformierten E. coli XL1-Blue auf 90 mm Kulturschalen plattiert und für 12-15 Stunden bei 31°C inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression durch die Zugabe von 60 µl einer 20 mM IPTG (Isopropylthiogalactoside) Lösung auf die Platten gestartet. Nach einer Inkubation 24 Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten für 72 Stunden bei 4 °C gelagert.  
10 Anschliessend erfolgte die Messung der Fluoreszenz.

Hierzu wurden die Bakterien mit einem Argon-Laser (LGN502) mit 100 mV bei 488 nm oder 366 nm (UVL21) bestrahlt. Die Fluoreszenz wurde unter Verwendung eines 510 nm ZSV Filters gemessen.

15 Zur Isolierung der Klone und spektralen Analyse wurde die Biomasse der Fluoreszenz positiven Klone von den Kulturplatten entfernt und in PBS (phosphate buffered saline) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall. Nach der Klärung des Lysates durch Zentrifugation wurde die Fluoreszenz des Überstandes im  
20 Fluorometer bestimmt.

Es wurde ein fluoreszierendes Protein identifiziert. Das fluoreszierende Protein wurde als CGFP (fluorescence protein of clytia gregaria) bezeichnet. Im Folgenden wird das fluoreszierende Protein CGFP im einzelnen dargestellt.

25 **CGFP**

Das fluoreszierende Protein CGFP zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu GFP aus Aequoria mit einer Identität von 44 % (gezeigt in Beispiel 8; Figur 5). Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in Beispiel 9;

Figur 6). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von CGFP. Funktionelle  
5 Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind. Bevorzugt ist eine Homologie von 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von 95 %.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme  
10 speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo,  
15 in Pflanzen

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergene für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

20 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Markerprotein, speziell bei der FACS (Fluorescence activated cell sorter) Sortierung.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für  
25 Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine, für Glykoproteine.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Immobilisierung speziell durch  
30 Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ,BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

10 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrate für biochemische Systeme speziell für Proteininasen und Kinasen.

15 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

20 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Komponente von Detektionsystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mirkoskopie.

25 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA-Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechslewirkungen (DNA : deoxyribonucleic acid; RNA : ribonucleic acid; ).

- 10 -

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

- 5 Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

10

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an DNA, an RNA.

15

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte fluoreszierende Protein CGFP eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

20

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

25

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flussströmungen.

30

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Expression in Expressionsystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefen Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

5

Das fluoreszierende Protein CGFP eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

10

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des fluoreszierenden Proteins CGFP speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

15

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von Zahnpasta, von Körperpudern.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

20

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

25

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

30

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

- 12 -

Die Erfindung bezieht sich desweiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuremolekülen, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren;
- b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
- 10 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen;
- 15 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines 20 fluoreszierenden Proteins aufweisen; und
- f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen.

25

Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zur Sequenz enthält.

30 Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorhergehend beschrieben, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA Sequenz der CGFP Moleküle sind.

Die Erfindung betrifft fluoreszierende Proteine, die durch die vorhergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

10 Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemässen fluoreszierenden Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

15 Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemässen fluoreszierenden Polypeptides.

20 Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemässen fluoreszierende Proteine erkannt werden.

25 Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemässen fluoreszierenden Proteine als Marker- und Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

#### **Expression der erfindungsgemässen fluoreszierenden Proteine**

Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens in eine geeignete Wirtszelle die Transkription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in Zellen von Prokaryoten oder Eukaryonten erforderlichen Kontrollsignale.

Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transcriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert.

5 Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsignale.

Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert,

10 das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsingale inklusive es Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch

15 zelluläre Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

20 **Reinigung der erfundungsgemäßen fluoreszierenden Proteine**

Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

25 Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt

30 erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und defiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nucleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit Streptomycin- oder Protaminsulfat). Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur Verfügung (absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen. Eine Säulenchromatographie wird auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extrazelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

- 16 -

Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

### Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

5

Das fluoreszierende Protein CGFP wird durch die folgende Nukleotidsequenz codiert (SEQ ID NO: 1):

5` -

atgactgcacttaccgaaggagcaaaactgttcgagaaagaaaattccctacattaca  
gagtttggaggagacgttgaaggaatgaaattcatcatcaaaggtaaggtaactggc  
gacgctactactggcaccatcaaagcgaaatatattgcacaactggtgacccct  
gtaccatggctaccatctttagtagtttgcgtatgggtttctgttgcctaag  
tatccacgccacattgccactttcaagagcacacaaccagatggttattcaca  
gacagaatcattttgacaatgatggacaatacgatgtcaaagccaaggtaact  
tatgaaaacggaacactttataatagagtacagtcaaaggtaactggcttcaaata  
aacggcaacatccttggtatgagagttcttaccattcaccacacgctgtctac  
atccttcctgaccgtaaaaatggggcatgaaaattgaatacaataaggcttcgac  
gttatggcggtggtcaccaaattggcggtcacgccccattcaataaaccacttag  
gcctggaaagaagattatccgttatcatcatcttaccgtatggacttccgg  
aaagatccggatgatgatgaaactgaccattgaccatcgtaagtcatcaaagct  
gttattttggaaacataccgttga-3`.

Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

MTALTEGAKLFEKEIPYITELEGDVEGMKFIIKGEGTGDATTGTIKAKYICTTGDL  
VPWATILSSLSYGVFCFAKYPRHIADFFKSTQPDGYSQDRIIISFDNDGQYDVKA  
VYENGTLYNRVTVKGTGFKSNGNILGMRVLYHSPPHAVYILPDRKNGGMKIEYNKA  
FDVMGGGHQMARAQFNKPLGAWEEDYPLYHHLTVWTSFGKDPPDDDETDLTIVEVI  
KA  
VDLETYR

30

Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

**Beschreibung der Figuren**

Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-CGFP.

5 Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-CGFP.

Die Fig. 3 zeigt die transiente Emission von CGFP in CHO-Zellen im Expressionsvector pcDNA3-CGFP. Die Figur zeigt die mikroskopische Aufnahme der transient transfizierten Zellen bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission  
10 von 520 nm.

Die Fig. 4 zeigt die Exitation des CGFP und des Kontrolllysates

Die Fig. 5 zeigt die Emission des CGFP und des Kontrolllysates

15 Die Fig. 6 zeigt das Alignent von CFGP, GFP (Aequoria) und GFP (Renilla) auf Aminosäureebene.

CGFP\_Cly : CGFP aus Clytia gregaria

20 GFP\_Ren : GFP aus Renilla

GFP\_Aeq . GFP aus Aequoria

Die Fig. 7 zeigt das Alignent von CFGP, GFP (Aequoria) und GFP (Renilla) auf Nukleinsäureebene.

25 CGFP\_Cly : CGFP aus Clytia gregaria

GFP\_Ren : GFP aus Renilla

GFP\_Aeq . GFP aus Aequoria

**Beispiele****Beispiel 1**

- 5      Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-CGFP bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-CGFP wurde zur Expression von CGFP in bakteriellen Systemen verwendet.
- 10     Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEx2-CGFP .

**Beispiel 2**

- 15     Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-CGFP bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-CGFP wurde zur Expression von CGFP in eukaryotischen Systemen verwendet.

Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-CGFP .

20

**Beispiel 3****Bakterielle Expression**

- 25     Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEx2-CGFP und pTriplEx2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch  
30     Zentrifugation geerntet, in PBS resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe eines Fluorometers bestimmt.

**Beispiel 4****Eukaryotische Expression**

5

Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-CGFP und pcDNA3.1(+) in transienten Experimenten. Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 10 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im Fluorometer bei Raumtemperatur.

15

Die Figur 3 zeigt die Expression von CGFP in CHO-Zellen.

**Beispiel 5****Spektrum des fluoreszierenden Proteins CGFP**

20

Zur Messung des Emissionsspektrums wurden E. coli BL21(DE3) mit den Plasmiden pTriplex2-CGFP und pTriplex2 transformiert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und einer Inkubation von 4 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Bakterien geerntet und in PBS resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Ultraschall. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz im 25 Fluorometer.

Die Figur 4 zeigt die Exitation des CGFP und des Kontrolllysates

30

Die Figur 5 zeigt die Emission des CGFP und des Kontrolllysates

- 20 -

### Beispiel 6

#### BLAST

##### 5 Ergebnis einer BLAST-Analyse von CFGP auf der Aminosäureebene.

10 >AA2002:ABB06186 Abb06186 Green fluorescent protein GFPxml9 SEQ ID, NO:15.  
5/2002, Length = 271, Score = 219 bits (558), Expect = 3e-56, Identities =  
102/228 (44%), Positives = 151/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

15 >gb|AAK02065.1| mutant green fluorescent protein [synthetic construct],  
Length = 238, Score = 219 bits (557), Expect = 4e-56, Identities = 102/227  
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

20 >gb|AAL33915.1|AF435430\_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],  
Length = 238, Score = 218 bits (556), Expect = 5e-56, Identities = 102/227  
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

25 >gb|AAL33918.1|AF435433\_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],  
Length = 238, Score = 218 bits (555), Expect = 7e-56, Identities = 101/227  
(44%), Positives = 149/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

30 >gb|AAL33916.1|AF435431\_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],  
Length = 238, Score = 218 bits (554), Expect = 9e-56  
Identities = 102/227 (44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

35 >gb|AAL33917.1|AF435432\_1 orange fluorescent protein [Aequorea  
macrodactyla], Length = 238, Score = 218 bits (554), Expect = 9e-56,  
Identities = 101/227 (44%), Positives = 149/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

40 >AA2002:ABB06185 Abb06185 Green fluorescent protein GFPxml8 SEQ ID, NO:13.  
5/2002, Length = 271, Score = 217 bits (552), Expect = 1e-55, Identities =  
101/228 (44%), Positives = 151/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

45 >AA2002:ABB06184 Abb06184 Green fluorescent protein GFPxml6 SEQ ID, NO:11.  
5/2002, Length = 271, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities =  
101/228 (44%), Positives = 150/228 (65%), Gaps = 3/228 (1%)

50 >gb|AAL33912.1|AF435427\_1 green fluorescent protein [Aequorea macrodactyla],  
Length = 238, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities = 101/227  
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

>gb|AAK02064.1| mutant green fluorescent protein [synthetic construct],  
Length = 238, Score = 216 bits (551), Expect = 2e-55, Identities = 101/227  
(44%), Positives = 150/227 (65%), Gaps = 3/227 (1%)

- 21 -

**Beispiel 7**

**BLAST**

- 5 Ergebnis einer BLAST-Analyse von CFGP auf Nukleinsäureebene.

>gb|AF468563.1| *Crassostrea gigas* clone c077 microsatellite sequence, Length = 415, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 25/27 (92%)  
10 >gb|AC079685.2| *Oryza sativa* chromosome 10 clone OSJNBb0012A20, complete sequence, Length = 131599, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 27/30 (90%)  
15 >gb|AF427906.1|AF427906 *Solenopsis globularia littoralis* putative odorant binding protein, precursor (Gp-9) gene, complete cds, Length = 1767, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 23/24 (95%)  
20 >gb|AF297617.1|AF297617 *Echinococcus granulosus* genotype 1 mitochondrion, complete genome, Length = 13588, Score = 41.1 bits (21), Expect = 1.4, Identities = 23/24 (95%)

**Beispiel 8**

- 25 Die Figur 6 zeigt das Alignent von CFGP, GFP (Aquoria) und GFP (Renilla) auf Nukleinsäureebene.

**Beispiel 9**

- 30 Die Figur 7 zeigt das Alignent von CFGP, GFP (Aquoria) und GFP (Renilla) auf Aminosäureebene.

- 22 -

Literatur / Patente

US patent no. 4,777,128

5 US patent no. 4,927,923

US patent no. 5,162,508

US patent no. 5,279,943

10

US patent no. 5,958,713

US patent no. 6,172,188

15 US patent no. 6,232,107

US patent no. 6,436,682

WO199623898

20

WO199711094

WO 199728261

25 WO1998/02571

WO199949019

WO200071565

30

WO200134824

WO200168824

WO200257451

5

Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54

10 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402

15 Cardullo et al. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8790-8794

20 Cormier, M.J., Hori, K., Karkhanis, Y.D., Anderson, J.M., Wampler, J.E., Morin, J.G., and Hastings, J.W. (1973) Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 81, 291-298.

Cormier, M.J., Hori, K., and Anderson, J.M. (1974) Bioluminescence in coelenterates. *Biochim. Biophys. Acta* 346, 137-164.

25 Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff

Davenport, D. and Nicol, J.A.C. (1955) Luminescence in Hydromedusae. *Proc. R. Soc. B* 144, 399-411.

30

- 24 -

- Delagrange et al., Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, Bio/Technology 13(2):151-154 (1995)
- Ehrig et al., Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitationspectra, FEBS Letters 367:163-166 (1995)
- Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.
- Heim et al., (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, Current Biology 6(2):178-182 (1996).
- Inouye S, Tsuji FI. (1994) Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80
- Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.
- Krieg, S., Castles, C., Allred, D., Benedix, M., Fuqua S., RNA from air-dried frozen sections for RT-PCR and differential display. *Biotechniques*. 1996 Sep;21(3):425-8.
- Levine, L.D. and Ward, W.W. (1982) Isolation and characterization of a photoprotein, "phialidin", and a spectrally unique green-fluorescent protein from the bioluminescent jellyfish *Phialidium gregarium*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 77-85.

- 25 -

- Mitra et al., Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein,  
*Gene* 73(1):13-17 (1996).
- 5      Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.
- Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Energy transfer in bioluminescent system.  
*J. Cell. Physiol.* 77, 313-318.
- 10     Phillips GN. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7
- Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72.
- 15     Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.
- 20     Ward, W.W. (1998) Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. In: *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols* (Chalfie, M. and Kain, S., eds) pp. 45-70. Wiley-Liss, Inc.
- 25     Ward et al., Energy Transfer Via Protein-Protein Interaction in Renilla Bioluminescence Photochemistry and Photobiology 27:389-396 (1978).
- Wampler, J.E., Hori, K., Lee, J.W., and Cormier, M.J. (1971) Structured bioluminescence. Two emitters during both the *in vitro* and the *in vivo* bioluminescence of the sea pansy, *Renilla*. *Biochemistry* 10, 2903-2909.
- 30

- 26 -

**Wampler, J.E., Karkhanis, Y.D., Morin, J.G., Cormier, M.J.** (1973) Similarities in the bioluminescence from the *Pennatulacea*. *Biochim. Biophys. Acta* 314, 104-109.

- 5 **Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R.**, Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology*. 1997 23(6) 1110ff

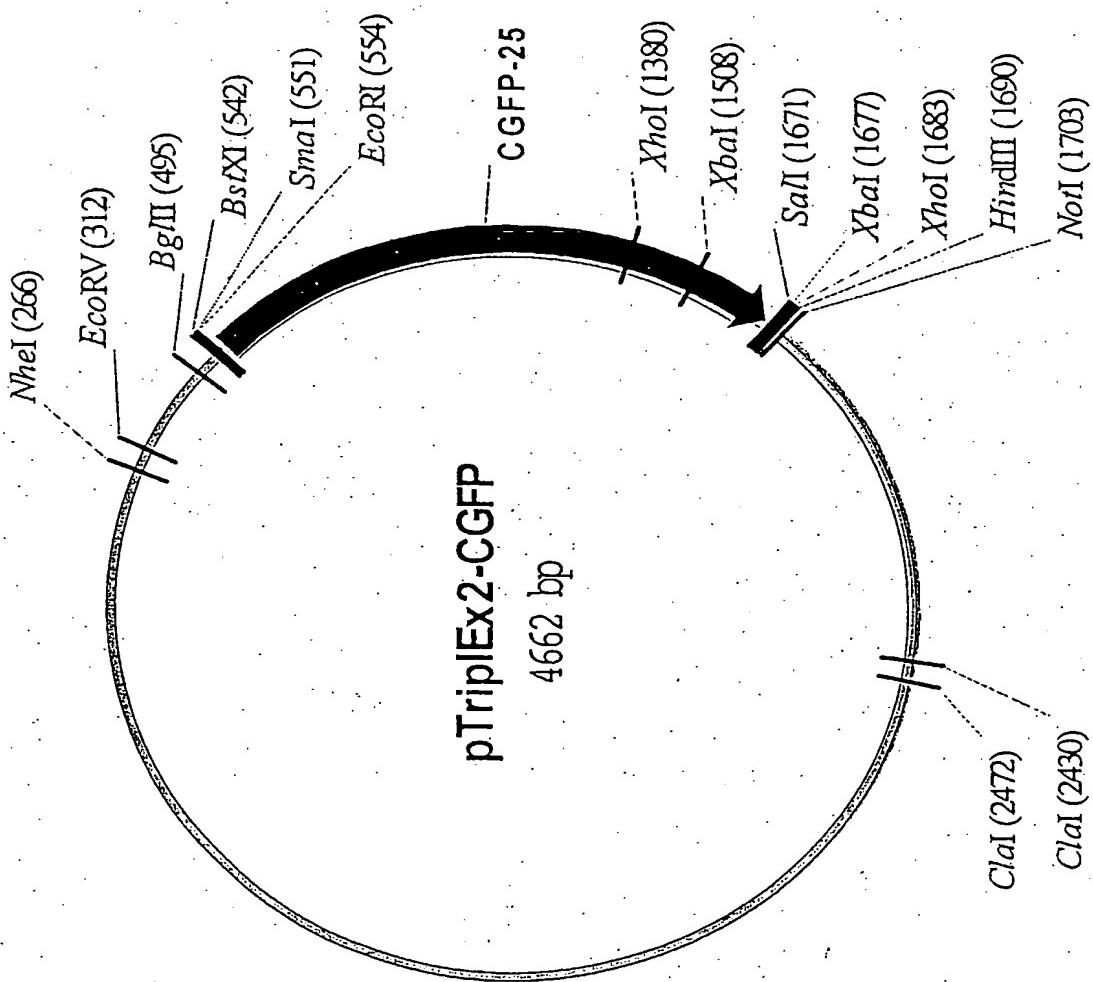
**Patentansprüche**

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - 5 a) Nukleinsäuremolekülen, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren;
  - b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
  - 10 c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen;
  - d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
  - 15 e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen; und
  - f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines fluoreszierenden Proteins aufweisen.
- 20 2. Moleküle nach Anspruch 1, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zur Sequenz enthält.
- 25 3. Moleküle nach Anspruch 2, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

4. Organismen, die einen nach Anspruch 3 beschriebenen Vektor enthalten.
5. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu DNA oder RNA Sequenzen nach Anspruch 1 sind.
6. Peptide, die durch die Nukleotidsequenzen nach Anspruch 1 kodiert sind.
- 10 7. Verfahren zur Expression der CGFP Polypeptide gemäss Anspruch 6 in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.
8. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines CGFP Polypeptides gemäss Anspruch 6.
- 15 9. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das fluoreszierende Protein CGFP erkannt werden.
- 20 10. Verwendung des fluoreszierenden Proteins CGFP gemäß den Ansprüchen 1 bis 7 als Marker- und Reportergen.

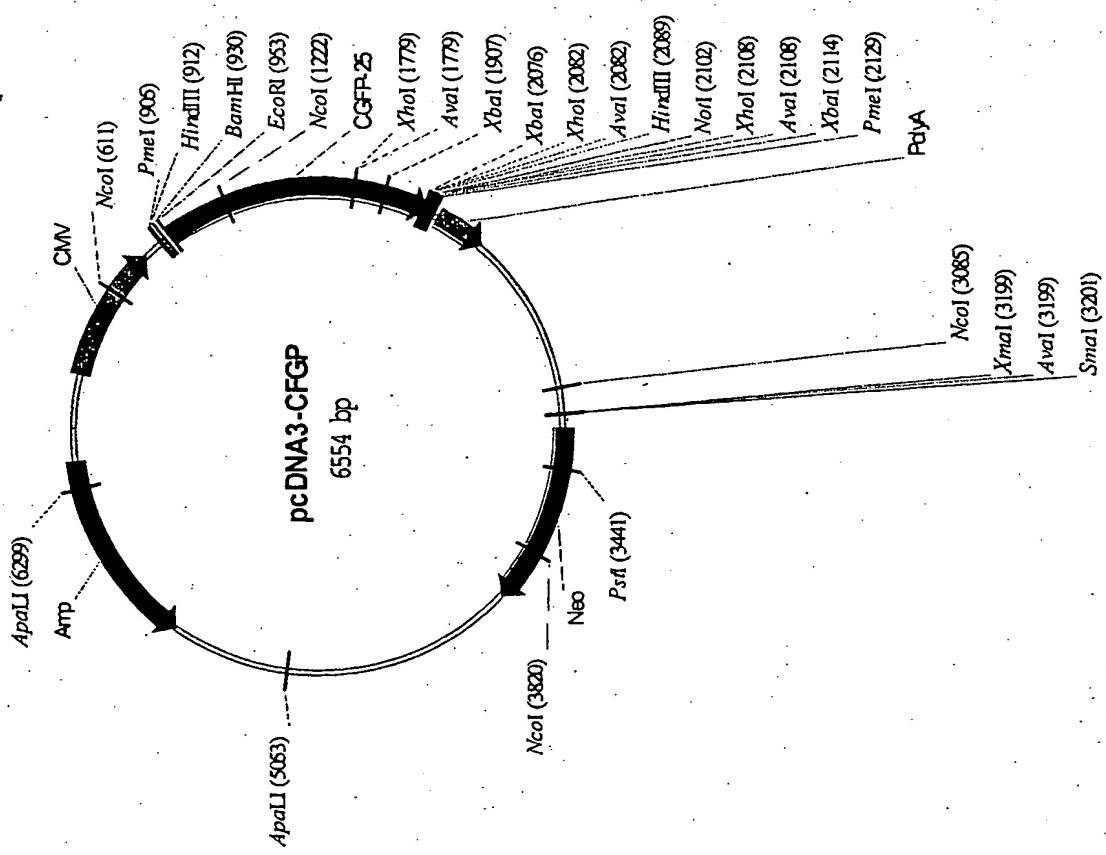
Figuren

Fig. 1



1009 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Fig. 2**

JC09 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2009

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/537614

WO 2004/052926

PCT/EP2003/013281

- 3/11 -

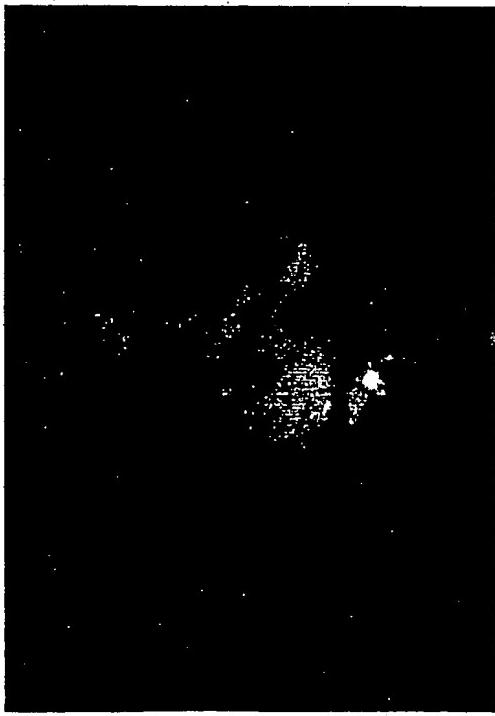


Fig. 3

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/537614

WO 2004/052926

PCT/EP2003/013281

- 4/11 -

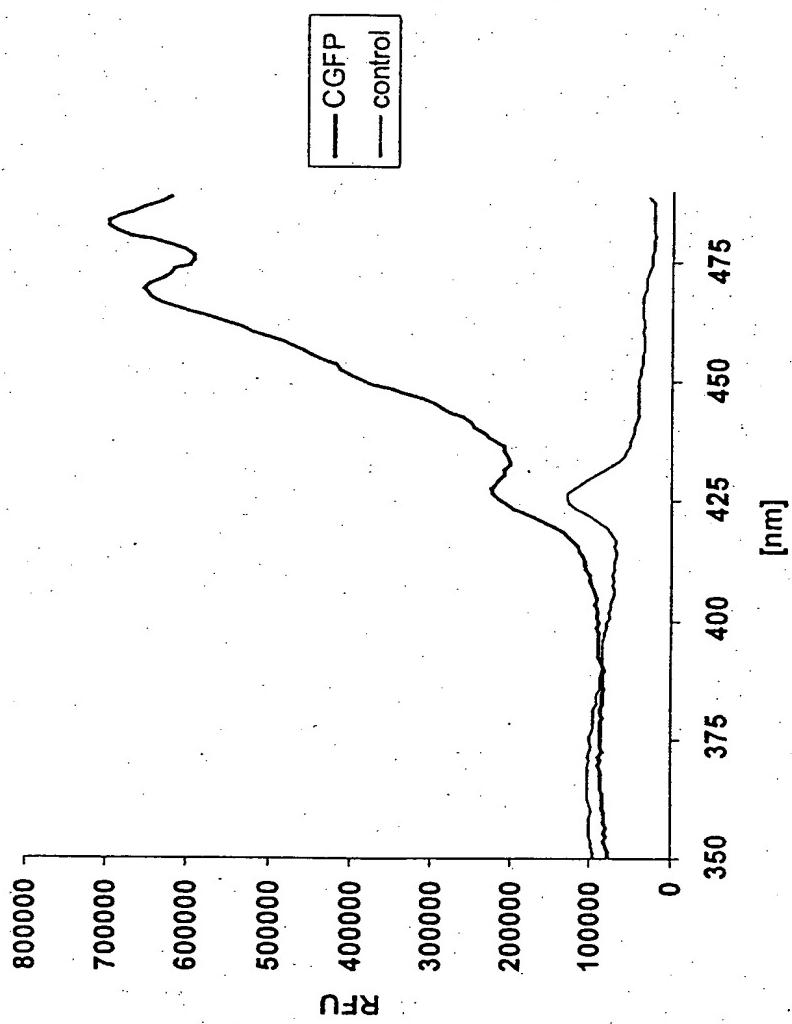


Fig. 4

JC09 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

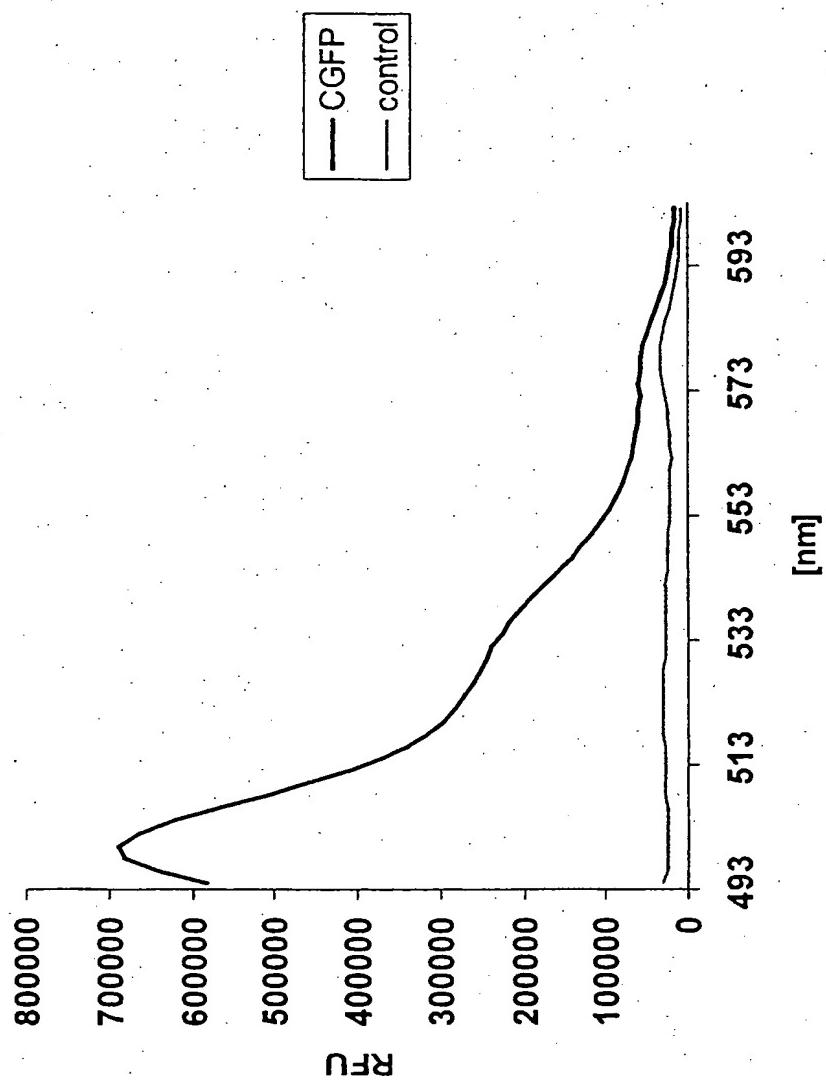


Fig. 5

US Pat & Tm Off PCT/PTO 03 JUN 2003

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Fig. 6

CGFP\_Cly 000 : MTALEGAKLFEKEIIPYITELEGDVEGMKFI IKGEGTGDATTGTTIKAKEYICCTTGD-LPVP  
 GFP\_Aeq 000 : . . . MSKGEELFTGVVPILVELDGDNQKF SVSGEGEQDATYGKLTLKFICTTGK-LPVP  
 GFP\_Ren 000 : MSKQILKNTCLQEVMSSYKVNLLEGIVNNHVFETMEGGKGKGNILFCGNQLVQIRVTKGAPLPFA

CGFP\_Cly 060 : WATISSLISYGVFCFAKYPRHIA-- DFFFKSTQPDGYSQDRIISFDNDGQYDVKA KVTYEN  
 GFP\_Aeq 060 : WPTLVTTFSYGVQCF SRYPDHM KQHDF FFKSAMPEGYVQERTIFYKDDGNYKTRAEVK FEG  
 GFP\_Ren 060 : FDIVSPAFQYGNRTFTKYPNDIS-- DYFIQSF PAGEFMYERTLRYEDGGLVEIRSDINLIE

CGFP\_Cly 120 : GTLYN RVTVKGTGFKSNGNILGMRVLYHSPPPHAVYILPDRKNGGMKIEYNKAFDVMGGGH  
 GFP\_Aeq 120 : DTLVNRIELKGIDFKE DGNILGHKMEYNN SHNVYIMADKP KNGIKVNFKIRHN IKDGSV  
 GFP\_Ren 120 : DKFVYRVEYKGSNF PDDGPVMQK TILGIEPSFEAMYM--- NNGVLVGEVILVYKLNSGR

CGFP\_Cly 180 : QMARHAQFNKPLIGAWEEDYPLYHILT-- VWTSGKDPDDDETDLTIVEVIKAVDL---  
 GFP\_Aeq 180 : QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH YLS-- TQSALS KDP-NEKRDHMLILEFVTAAGITHGM  
 GFP\_Ren 180 : YY SCHMKTLMKSKGVVKEFPSYHFIQHRLEKTYVEDGGFVEQHETAIAQMITSIGKPLGSL

CGFP\_Cly 240 : - ETYR  
 GFP\_Aeq 240 : DELYK  
 GFP\_Ren 240 : HEWV

JC09 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

~~PAGE BLANK (USPTO)~~

Fig. 7

CGFP\_Cly\_000 : atgactgcacttaccgaaggagcaaaactttcgagaaatccctacattacagag  
GFP\_Ren\_000 : attagtaaacaataatttgaagaacactttacaagaatgtcgataaagttaaat  
GFP\_Aeq\_000 : attagtaaaggagaactttcactggagttgtcccaatttttgaaatttagatggc

CGFP\_Cly\_060 : ttggaaaggagacgttgaaggaattcatcaaaggtaaggacttggcgacgct  
GFP\_Ren\_060 : ctggaaaggaaatttgtaaacaaccatgtttacaatggagggttgccaaaggaaatatt  
GFP\_Aeq\_060 : gatgttaatggccaaaattcttcagtggaggggttgcgttgcataacacatcacggaa

CGFP\_Cly\_120 : actactggcaccatcaaaggcgaaatataatttgccacaactgggtgacctccctgttacccatgg  
GFP\_Ren\_120 : ttattcggcaatcaaactgggttcagattcgtgtcacgaaaggggccactgccttttgca  
GFP\_Aeq\_120 : aaacttacccttaaaattttgcactacttgcgttccatggaaagctacccatggccaaacactt

CGFP\_Cly\_180:gctaccatttgagtagttgtcgatgggtttcgtaagtatccacqccac  
GFP\_Ren\_180:tttgatatttgtcaccaggctttcaatatggcaaccgtactttcacgaatatccgaat  
GFP\_Aeq\_180:gtcactactttatgggtttcaatgtttcaagatacccagatcatatgaaacag

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CGFP\_Cly\_240 : attgccgactttcaagaggcacacaaccaggatgttattccaaaggacagaatcatttagt  
GFP\_Ren\_240 : gataatatcagatttttatacaatcattccaggatttatgtatgtaaacggaaactatattttac  
GFP\_Aeg\_240 : catgactttcaagagtgtccatgcccgaaggttatgtacagggaaactatattttac

CGFP\_Cly\_300 :tttgacaatgtggacaatacgatgtcaaagccaaaggttacttatgaaaacggaaacctt  
GFP\_Ren\_300 :cgttacgaatgtggacttgttgcatttcagatataaatttaatagaagaacaag  
GFP\_Aeq\_300 :aaaagatgtggaaactacaagacacgtgtcaagtttgaagggttatcccttgtt

CGFP\_Cly\_360 : tataatagagtccacagtcaaagggtactggcttcaaatacggcaacatcaaaccatcccttgtatg  
GFP\_Ren\_360 : ttcgctctacagagtggaaatacaaaggtagtaacttcccagatggatgtcccgatcatgcag  
GFP\_Aeq\_360 : aatagaatcgagttaaaaggattgattttaaaggatggaaacattctggacacaaaa

CGFP\_Cly\_060 : ttggaaaggagacgttgaaggaattcatcaaaggtaaggacttgcggacgct  
GFP\_Ren\_060 : ctggaaaggaaattgttaacaatggaggttgcggcaaggaaatatt  
GFP\_Aeq\_060 : gatgttaatggccaaaattcttcagtggagggttgcaggatgttgcacatacggaa

JC09 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CGFP\_C1Y\_120:actactggcaccatcaaaggaaataatttgcacaactgggtgacccttcctgtaccatgg  
GFP\_Ren\_120:ttattccggcaatcaactcggttcagattcgatgtcacgaaaggccccactgccttttgc  
GFP\_Aeq\_120:aaacttaccccaaattttatggcactactggaaagctaccctgtccatggccaaacctt

CGFP\_C1Y\_180:gctaccatcttgagttagtttgtatggttttctgtttcgcttaagtttatccacgcccac  
GFP\_Ren\_180:tttgtatatttgttcaccagtttcaatatggcaaccgtactttcacgaaataatccgaat  
GFP\_Aeq\_180:gtcactactttctttatggttcaatgctttcaagataaccaggatcatatgaaaacag

CGFP\_C1Y\_240:attgccgactttcaagaggcacacaaccatggtttattcacaaagacagaattcatttagt  
GFP\_Ren\_240:gatatatcagattttatacaatcattccaggatttatgttatgttatgttatattttac  
GFP\_Aeq\_240:catgactttcaagaggatgcccattgcccattgccaagggttatgttatgttatgttatattttac

CGFP\_C1Y\_300:tttgacaatgtggacaatacgatgtcaaggtaactttatgtaaaaacggaaacctt  
GFP\_Ren\_300:cgttacgaaagatggggactttgttgttgcgttcagatataattaaatagaagacaag  
GFP\_Aeq\_300:aaagatgacggaaactacaaggacacgtgtcaagtttgaagggttatacccttgtt

CGFP\_C1Y\_360:tataatagagtcaaggtaactggctcaaatcaacggcaacatcccttgtatgt  
GFP\_Ren\_360:ttcgttctacagaaatacaaggtagtgcgttatgtttcccgatgttgtccgtcatgcag  
GFP\_Aeq\_360:aatagaatcgaggtaaaaaggtagttttaaagaagatggaaacattttggacacaaa

JCD9 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CGFP\_Cly\_480 :ggcatgaaaatttgaataacaataaggctttcgacgttatggcggtggtcaccaatggcg  
GFP\_Ren\_480 :gtcggccagaagtaattttgtctataactaaactctggaaatattatcatgtcacatg  
GFP\_Aeq\_480 :atcaaagttaacttcataaaatttagacacacattaaagatggaaaggcttcaatttagcagac

CGFP\_Cly\_540 : cgtcacgcccattcaataaccacttaggagcctgtggaaagaaggatattccgttgttatcat  
GFP\_Ren\_540 : aaaaacattaatgaagttagttaagggttcgttatcattttattcaa  
GFP\_Aeq\_540 : cattatcaaaaaatactccaattggcgatggccctgtcctttaccagacaaccattac

CGFP\_Cly\_600 : catcttacccgtatggactttcgaaaaagatccggatgtatgtaaactgaccatttg  
 GFP\_Ren\_600 : catcgtttggaaaagacttacgttagaaaaagacttacggacggggttcgttgaacagcatgactgct  
 GFP\_Aeq\_600 : ctgtccacacaatctgcctttccaaagatccaaacgaaaaggagatcacatgtatcctt

CGFP\_Cly\_660 : accatcgtcgaagtcatcaaaggctttgatttggaaacataccgttgta-----  
GFP\_Ren\_660 : atttgtcaaatgacatctataggaaaaccacttaggatccttacacg-----  
GFP\_Aeq\_660 : ctttagtttgtaaacagctgtggattacacatggcatggatgaaactataaaaaatg

USPTO Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

107537614

WO 2004/052926

PCT/EP2003/013281

-11/11-

CGFP\_C1Y\_720:  
GFP\_Ren\_720:----g--gt----ttaa  
GFP\_Aeq\_720:tccagactccaaattga

JC09 Rec'd PCT/PTO 03 JUN 2005

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**